Aus der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. Dr. h. c. H. E. Bock

Untersuchungen zur enzymatischen Bestimmung von Acetacetat und β-Hydroxybutyrat im Urin

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Klinische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Roswitha Wittemann, geb. Eisert
aus Waiblingen

1970

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547609_0027

Aus der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. Dr. h. c. H. E. Bock

Untersuchungen zur enzymatischen Bestimmung von Acetacetat und β-Hydroxybutyrat im Urin

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Klinische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Roswitha Wittemann, geb. Eisert
aus Waiblingen

1970

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. J. Hirschmann

1. Berichterstatter: Professor Dr. M. Eggstein
2. Berichterstatter: Professor Dr. Dr. h.c. H.-E. Bock

FOTODRUCK PRÄZIS Barbara v.Spangenberg KG • Tübingen

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	5
II. Methodik	7
a) Geräte	
b) Reagenzien	
c) Methode zur Bestimmung der Acetessigsäure	8
1. Prinzip	
2. Ausführung	
3. Berechnung	
d) Methode zur Bestimmung der ß-Hydroxybuttersäure	11
1. Prinzip	
2. Ausführung	
3. Berechnung	
III. Richtlinien für die Überprüfung der Untersuchungsmethoden	14
IV. Ergebnisse	
1. Acetessigsäure	
a) Kontrolle der Empfindlichkeit	16
b) Wiederholbarkeit aus demselben Extrakt	17
c) Stabilität der Acetacetatkonzentration in einer Urinprobe	18
d) Stabilität der Acetacetatkonzentration im neutralen Extrakt	20
2. ß-Hydroxybuttersäure	
a) Kontrolle der Empfindlichkeit	22
b) Wiederholbarkeit der ß-Hydroxybuttersäurebestimmung aus demselben Extrakt	23
c) Stabilität der ß-Hydroxybuttersäurekonzentration in einer Urinprobe	24

Seite

d) Stabilität der ß-Hydroxybuttersäurekonzentration im alkalischen Extrakt 26

e) Linearität und Richtigkeit der Bestimmung von ß-Hydroxybuttersäure in wässriger Testlösung 28

f) Linearität und Richtigkeit der Bestimmung von ß-Hydroxybuttersäure in einer Urinprobe 30

3. Vergleichende Untersuchungen des Acetessigsäure- (und ß-Hydroxybuttersäure-) Gehaltes im Urin mit Acetest^{R} und Ketostix^{R} und mit der enzymatischen Meßmethode

a) Grundlagen und methodische Angaben für den Gebrauch der Schnellreagenzien Acetest^{R} und Ketostix^{R} 33

b) Beschreibung der Versuche mit Acetest^{R} und Ketostix^{R} 34

c) Beschreibung der enzymatischen Messungen und Vergleich der beiden Meßreihen 35

4. Beschreibung der Ketonämie und Ketonurie unter Nulldiät

a) Ergebnisse der enzymatischen Acetessigsäurebestimmung im Vollblut 37

b) Ergebnisse der mit Acetest^{R} und Ketostix^{R} bestimmten Acetessigsäurekonzentration im Urin 40

c) Ergebnisse der enzymatisch bestimmten Acetessigsäurekonzentration im Urin 42

d) Berechnung der Acetacetat-"Clearance" 45

V. Diskussion

1. der enzymatischen Acetacetatbestimmung im Urin 48

Seite

2. der enzymatischen ß-Hydroxybuttersäure im Urin 51
3. Vergleichende Untersuchungen des Acetessigsäure- und ß-Hydroxybuttersäuregehaltes im Urin mit Acetest^{R} und Ketostix^{R} und mit der enzymatischen Messmethode 54
4. Ketonämie und Ketonurie unter Nulldiät 56

VI. Zusammenfassung 58

Literaturverzeichnis 60

I. Einleitung

1. Entstehung der Ketonkörper im Organismus

Unter den Ketonkörpern verstehen wir die C_4-Säuren ß-Hydroxybuttersäure und Acetessigsäure. Letztere ist der primäre Ketonkörper, während ß-Hydroxybuttersäure und Aceton aus ihr in sekundären Prozessen gebildet werden. Aceton entsteht aus Acetessigsäure bereits durch spontane Decarboxylierung (3).

Der alleinige Bildungsort der Ketonkörper ist die Leber, also das Organ, in dem der Fettabbau zum größten Teil abläuft. Bei der Fettverbrennung fallen als normales Zwischenprodukt Acet-Acetyl-CoA und Acetyl-CoA an. Diese an CoA gebundenen Vorstufen sind an bestimmte Zellstrukturen, damit an die Leberzelle, gebunden. Über einen von LYNEN (13) als ß-Oxy-ß-methylglutaryl-CoA-Cyklus beschriebenen, enzymatisch gesteuerten Kreisprozess entstehen über Zwischenprodukte die freie Acetessigsäure und ß-Hydroxybuttersäure. Diese Ketonkörper sind nicht zellfixiert, sondern transportabel und können von verschiedenen Organen (Herzmuskel, Gehirn) zur Energiegewinnung verbrannt werden (14).

Mit der Ketonaemie werden Acetessigsäure und ß-Hydroxybuttersäure allerdings auch über die Nieren ausgeschieden. Der Acetongehalt im frischgelassenen Urin ist jedoch meist sehr gering, da die größte Ausscheidung über die Atemluft erfolgt (15).

2. Bisherige Bestimmungsmethoden

Die bisherige Bestimmung der ketonkörper erfolgte mit chemischen Nachweisreaktionen entweder qualitativ, semiquantitativ oder quantitativ (GERHARDT, LIEBEN, LEGAL, LANGE, FROMMER, KAISER, ARREGUINE-GARCIA, MESSINGER-

HUPPERT, EMDEN-SCHMITZ, HARD u.a.).

Diese Methoden sind meist nicht spezifisch, so daß die Ergebnisse durch andere im Urin in wechselnder Menge vorhandene Stoffe verfälscht werden können.

3. Enzymatische Bestimmungsmethode

Als alleinige spezifische Bestimmungsmethode kommt die enzymatische Bestimmung in Frage. Durch die milden Reaktionsbedingungen ermöglichen Enzyme oft erst Nachweis und Bestimmung von labilen Substanzen, die mit anderen Verfahren nur sehr ungenau bestimmt werden können (1). Von WILLIAMSON, MELLANBY und KREBS (17) wurde eine enzymatische Methode zur Bestimmung von Acetessigsäure und ß-Hydroxybuttersäure im Blut angegeben.

Der Zweck dieser Arbeit bestand nun darin, diese von EGGSTEIN (8) modifizierte Methode zur Bestimmung der Ketonkörper im Urin zu untersuchen. Gleichzeitig wurden Vergleiche mit den Ames-Schnellreagenzien Acetest^{R} und Ketostix^{R} am Krankengut der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen angestellt.

Eine Quantifizierung der Reagenzien zur Festlegung ihrer Empfindlichkeit interessiert, haben sie doch in jüngster Zeit für den Ketonkörpernachweis in Urin und Serum in die klinische Praxis Eingang gefunden (4, 9).

Folgende Abkürzungen werden in dieser Arbeit verwendet: Lactatdehydrogenase = LDH, ß-Hydroxybutyratdehydrogenase = ß-HBDH, Nicotinamid-adenin-dinucleotid = NAD^{+}, reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid = $NADH+H^{+}$, Malatdehydrogenase = MDH.

II. Methodik

a) Geräte

Die Absorptionsmessungen wurden mit einem Photometer "Eppendorf", Fa. Netheler & Hinz, Hamburg, und einem adaptierten Schreiber durchgeführt. Es wurden Mikropipetten, Fa. Netheler & Hinz, Hamburg, und Mikroreaktionsgefäße verwendet.

b) Reagenzien

Die zur Bestimmung der Acetessigsäure und der Dl-ß-Hydroxybuttersäure benötigten Enzyme MDH, LDH und ß-HBDH stammten von der Fa. Boehringer, Mannheim. Alle übrigen Reagenzien in p.a. Qualität wurden von der Fa. Merck, Darmstadt, bezogen.

Im einzelnen wurden folgende Testzusammensetzungen verwendet:

Für die Bestimmung von

aa) Acetessigsäure

1) Kaliumphosphat K_3PO_4 x 3 H_2O (1,98 M)
2) Reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid NADH-Na_2 (0,005 M ß-NADH+ H^+)
3) Lactat-Dehydrogenase LDH (5 mg Enzym/ml)
4) Malat-Dehydrogenase MDH (5 mg Enzym/10 ml) im Verhältnis 1:10 gemischt
5) Perchlorsäure 0,8 M, p.a., Dichte 1,67, 70%
6) ß-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase ß-HBDH (5 mg Enzym/ml)

bb) ß-Hydroxybuttersäure

1) Kaliumcarbonat K_2CO_3 p.a., 1 M
2) Kaliumhydroxyd, Plätzchenform, KOH p.a., 3 M
3) Perchlorsäure, p.a., Dichte 1,67, 70%, 0,8 M
4) Nicotinamid-adenin-dinucleotid NAD (0,025 M ß-NAD)
5) Lactatdehydrogenase LDH (5 mg Enzym/ml)

6) Malatdehydrogenase MDH (5 mg Enzym/10 ml) im Verhältnis 1:10 gemischt
7) ß-Hydroxybutyratdehydrogenase ß-HBDH (5 mg Enzym/ml)
8) Glycin-Hydranzinpuffer aus dem Boehringer-Lactat-Programm pH 9,0 (Glas 1 mit Aqua bidest. ad 75,0 ml verdünnt)

c) Methode zur Bestimmung der Acetessigsäure

1. Prinzip

Acetacetat wird durch reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NADH) mittels ß-HBDH in D-(-)-ß-Hydroxybutyrat übergeführt.

$$\text{Acetacetat} + \text{NADH}+\text{H}^+ \longrightarrow \text{D-(-)-ß-Hydroxybutyrat} + \text{NAD}^+$$

Die Abnahme der NADH-Menge ist proportional der Acetacetatmenge. NADH ist Meßgröße und auf Grund seiner Absorption bei 340 nm oder 366 nm leicht zu bestimmen.
Wegen möglicher Verunreinigung der ß-HBDH mit MDH und LDH ist es notwendig, im Blut bzw. Urin vorhandenes Pyruvat und Oxalacetat vor der Acetacetat-ß-Hydroxybutyrat-Reaktion durch NADH mittels LDH und MDH hydrieren zu lassen.

$$\text{Pyruvat} + \text{NADH}+\text{H}^+ \longrightarrow \text{Lactat} + \text{NAD}^+$$
$$\text{Oxalacetat} + \text{NADH}+\text{H}^+ \longrightarrow \text{Malat} + \text{NAD}^+$$

Es wurde daher eine Vorinkubation vorgenommen.
Die Extinktionsmessung wurde bei einer Wellenlänge von 334 nm durchgeführt.

2. Ausführung

a) In möglichst genauer Anlehnung an die von EGGSTEIN (8) modifizierte Acetacetatbestimmung im

Vollblut werden 4 ml abzentrifugierter Urin in 4 ml eiskalte 0,8 M $HClO_4$ pipettiert, gemischt und 10 min. zentrifugiert.
Die Proben werden bis zur Durchführung des optischen Tests eisgekühlt gehalten, um eine Konzentrationsabnahme von Acetacetat zu vermeiden.

3,0 ml des eisgekühlten Überstandes (vom restlichen Überstand werden 2,0 ml für die ß-Hydroxybutyratbestimmung eingesetzt) werden mit 0,4 ml Kaliumphosphat versetzt, um ein neutrales pH in den meist leicht sauren Urinproben zu erreichen.

Nach gründlichem Durchmischen werden die Proben für 30 min. ins Eisbad gestellt; anschließend wird der klare Überstand dekantiert.
Vom gepufferten Überstand werden 1,0 ml nach Temperieren auf Raumtemperatur zum optischen Test eingesetzt.

b) Optischer Test

In eine MT 4-Küvette werden nacheinander pipettiert:

gepufferter Überstand	1,0 ml
NADH-Lösung	0,05ml

Nachdem die Substanzen gemischt und im Photometer eingestellt sind, wird das

LDH/MDH-Gemisch	0,01 ml zugegeben

und der Leerschleich bei Filter 334 über 10 min. kinetisch registriert. Anschließend wird

ß-HBDH	0,02 ml zugesetzt

und die Reaktion eine halbe Stunde geschrieben.

3. Berechnung

a) Im Gegensatz zur Bestimmung im Vollblut braucht hier keine durch Enteiweißung eingetretene Verdünnung berücksichtigt zu werden.

Es entsprechen also

4 ml Urin = 8 ml Extrakt

3 ml Extrakt entsprechen somit 1,5 ml Urin.

Zur Neutralisation werden 3 ml Extrakt mit 0,4 ml K_3PO_4-Lösung versetzt, und von diesen 3,4 ml zum Test 1,0 ml eingesetzt

= 0,441 ml Urin.

1,0 ml Urin sind nach

$\frac{1}{0,441}$ = 2,27 ml Überstand aliquot.

Statt 1,0 ml Ansatzvolumen läuft der Test bei 1,08 ml Volumen. Daraus ergibt sich als Endfaktor für µMol Acetacetat/ml und Messung bei 334 nm:

0,166 x 2,27 x 1,08 = 0,407

366 nm:

0,303 x 2,27 x 1,08 = 0,743

Der gefundene Extinktionswert wird mit diesem Faktor multipliziert.

b) Bei stärker sauren Urinproben (pH < 6,5) muß zur Neutralisation etwas mehr K_3PO_4-Lösung verwendet werden. Bei einer Menge von 0,5 ml K_3PO_4-Lösung erwiesen sich alle Überstände als neutral. Für die Faktorenberechnung ergibt sich daraus, daß 3,5 ml Extrakt einer Urinmenge von 1,5 ml entsprechen.

1,0 ml Überstand entsprechen somit

$\frac{1,5}{3,5}$ = 0,429 ml Urin.

1,0 ml Urin sind nach

$\frac{1}{0,429}$ = 2,33 ml Überstand aliquot.

Als Endfaktor ergibt sich daraus für ein Ansatzvolumen von 1,08 ml bei

334 nm:

0,166 x 2,33 x 1,08 = 0,418

366 nm:

0,303 x 2,33 x 1,08 = 0,762

Bei den Untersuchungsergebnissen wurde der jeweils verwendete Faktor vermerkt, ebenso eine eventuelle Verdünnung des Überstandes, die bei stark konzentrierten bzw. urochromhaltigen Urinproben oftmals erforderlich war.

d) Methode zur Bestimmung der ß-Hydroxybuttersäure

1. Prinzip

D-(-)-ß-Hydroxybuttersäure wird durch Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD) mittels ß-HBDH in Acetacetat übergeführt.

$$\text{D-(-)-ß-Hydroxybutyrat} + NAD^+ \longrightarrow \text{Acetacetat} + NADH+H^+$$

Das Gleichgewicht der Reaktion liegt zwar auf der Seite von ß-Hydroxybutyrat und NAD. Es kann jedoch durch NAD-Überschuß und alkalisches Milieu völlig auf die Seite von Acetacetat und NADH verschoben werden. NADH ist Meßgröße und wie bei der Acetacetatbestimmung auf Grund seiner Absorption bei 340 oder 366 nm leicht zu bestimmen.
Auch hier wird mit LDH/MDH-Gemisch vorinkubiert, um Lactat und Malat abreagieren zu lassen, und Extinktionsstillstand abgewartet.

2. Ausführung

a) Im allgemeinen werden Acetacetat und ß-Hydroxybutyrat gleichzeitig bestimmt, so daß vom eisgekühlten Überstand, aus dem die Acetacetatbestimmung erfolgte, 2 ml für die ß-Hydroxybutyratbe-

stimmung eingesetzt werden können.

2,0 ml des Überstandes werden mit 0,3 ml KOH/K_2CO_3-Lösung versetzt. Nach gründlichem Durchmischen werden die Proben ins Eisbad gestellt. Anschließend wird der klare Überstand dekantiert.

0,8 ml Überstand werden nach Temperieren auf 37°C zum optischen Test eingesetzt.

b) Vorinkubation und optischer Test
Zur Vorinkubation (Lactat/Malat-Bestimmung) werden 0,8 ml Überstand und 0,5 ml Glycin-Hydrazinpuffer in Mikroreaktionsgefäße einpipettiert. Der pH-Wert von 9,6 muß mit Lyphanpapier kontrolliert und gegebenenfalls mit 0,1 M KOH/K_2CO_3-Lösung eingestellt werden.

Dazu werden 0,1 ml NAD-Lösung und 0,01 ml LDH/MDH-Gemisch einpipettiert und gut durchmischt. Die abgelaufene Reaktion steht nach 2 Std. bei 37°C.

Nun wird die Probe quantitativ in MT 4-Küvetten übergeführt und ins Photometer eingesetzt. Die Messung erfolgte bei 334 oder 366 nm. Man startet die Reaktion durch Zugabe von 0,02 ml ß-HBDH und mißt sofort die Extinktion E_1. Nun wird der Reaktionsablauf 60' lang bei 37°C registriert und danach die Extinktion E_2 gemessen.

3. Berechnung

a) Wie bei der Acetacetatbestimmung entsprechen
4 ml Urin = 8 ml Extrakt
2 ml Extrakt entsprechen somit 1,0 ml Urin. Zur Alkalisierung werden 2,0 ml Extrakt mit 0,3 ml KOH/K_2CO_3-Lösung versetzt, und von diesen 2,3 ml zum Test 0,8 ml eingesetzt
= 0,348 ml Urin.
1,0 ml Urin sind nach

$$\frac{1}{0,348} = 2,873 \text{ ml Überstand aliquot.}$$

Statt 1,0 ml Ansatzvolumen läuft der Test bei 1,43 ml Volumen. Somit resultiert als Endfaktor für µMol/ml und Messung bei

334 nm:

$$0{,}166 \times 2{,}873 \times 1{,}43 = \underline{0{,}682}$$

366 nm:

$$0{,}303 \times 2{,}873 \times 1{,}43 = \underline{1{,}245}$$

Der gefundene Extinktionswert wird mit diesem Faktor multipliziert.

b) Um konstante pH-Werte auch bei stärker sauren Urinproben zu gewährleisten, wurden hier 0,4 ml KOH/K_3PO_4-Lösung eingesetzt. Daraus ergibt sich für die Faktorberechnung:

2,4 ml Extrakt entsprechen 1,0 ml Urin.

0,8 ml Überstand entsprechen somit 0,333 ml Urin.

1,0 ml Urin sind nach

$$\frac{1}{0{,}333} = 3{,}000 \text{ ml Überstand aliquot.}$$

Als Endfaktor ergibt sich daraus für ein Ansatzvolumen von 1,43 ml bei

334 nm:

$$0{,}166 \times 3{,}000 \times 1{,}43 = \underline{0{,}712}$$

366 nm:

$$0{,}303 \times 3{,}000 \times 1{,}43 = \underline{1{,}299}$$

Auch hier wurden jeweils Faktor und Verdünnung bei den Untersuchungsergebnissen vermerkt.

III. Richtlinien für die Überprüfung der Untersuchungsmethoden

Es wurden folgende Bestimmungen durchgeführt:

a) Bestimmung von mindestens 10 Leerwerten zur Überprüfung der Empfindlichkeit. Die Empfindlichkeit ist definiert als die kleinste Menge noch sicher bestimmbaren Substrates ausgedrückt durch das 2-fache der Standardabweichung des Mittelwertes der Leerwerte (10).

b) Aufstellung einer Eichkurve zur Prüfung der Linearität und Richtigkeit einer Methode bei ansteigenden Mengen Substrat. Die Richtigkeit ist definiert als die Abweichung des Mittelwertes der gemessenen Werte von dem vorgelegten Wert, ausgedrückt durch den Regressionskoeffizienten b und den Korrelationskoeffizienten r (10).

c) Zumischversuche und Aufstellung einer Eichkurve zur Prüfung der Linearität und Richtigkeit bei ansteigenden Mengen zugemischten Substrates.

d) Bestimmung von mindestens 10 gleichen Werten aus einer Urinprobe zur Prüfung der Wiederholbarkeit der Messungen in Urinproben.
Die Wiederholbarkeit ist definiert als die Abweichung der Messergebnisse von ihrem Mittelwert bei Bestimmung durch den gleichen Untersucher unter identischen Verhältnissen, also bei Serienmessungen, ausgedrückt durch den Variationskoeffizienten VK.

e) Um die Stabilität der Substrate in den Urinproben zu untersuchen, wurden die frischen Proben bis zur Perchlorsäurefällung verschlossen über Stunden unter verschiedenen Temperaturbedingungen stehengelassen.

f) Ebenso wurde die Stabilität der Substrate in den jeweiligen Extrakten über mehrere Tage untersucht.

Bei Acetessigsäure wurden keine Eichkurven aufgestellt, da Acetessigsäure als Substanz leicht durch Luftsauerstoff zu Aceton oxydiert wird. Eine Einstellung auf einen festen Wert ist daher nur sehr ungenau.

IV. Ergebnisse

1. Acetessigsäure

a) Kontrolle der Empfindlichkeit (s. Tab. I)

Die Extinktion der Leerwerte schwankte zwischen E = 0,037 und E = 0,048. Dies entspricht einem Acetessigsäuregehalt von im Mittel 14,727 /uMol/l bei einer Streubreite von 13,0 /uMol/l bis 17,0 /uMol/l. Die Standardabweichung betrug S = ± 1,27 /uMol/l. Für die Empfindlichkeit ergibt sich nach der Definition 2,54 /uMol/l.

LINDEN (12) fand für die Bestimmung von Acetacetat im Blut eine Empfindlichkeit von 3,6 /uMol/l.

Nr.	Extinktion	/uMol/l
1	0.048	17
2	0.038	14
3	0.045	16
4	0.042	15
5	0.037	13
6	0.038	14
7	0.040	15
8	0.038	14
9	0.037	13
10	0.042	15
11	0.043	16
$\bar{x}$		14,727
S		± 1,27
Vk		8,55%

Tabelle I: Leerwerte zur Acetessigsäure-Bestimmung

b) Wiederholbarkeit aus demselben Extrakt (s. Tab. II)

Aus einer von einem Diabetiker gewonnenen Urinprobe wurden 12 Bestimmungen unter identischen Bedingungen vorgenommen. Hierbei fand sich eine gute Wiederholbarkeit. Bei den Bestimmungen fanden wir im Mittel 1270,66 µMol/l bei einer Streubreite von 1250 µMol/l bis 1296 µMol/l. Die Standardabweichung betrug 14,99 µMol/l bei einem mittleren Fehler des Mittelwertes von 4,53 µMol/l und einem Variationskoeffizienten Vk von 1,18 %.

Nr.	Extinktion	gefunden µMol/l
1	0.305	1275
2	0.299	1250
3	0.303	1267
4	0.300	1254
5	0.304	1270
6	0.305	1275
7	0.308	1287
8	0.304	1270
9	0.308	1287
10	0.310	1296
11	0.299	1250
12	0.303	1267
$\bar{x}$		1270,66
S		14,99
$S_{\bar{x}}$		4,53
Vk		1,18 %
Verd.	1 : 10	
F	4180	

Tabelle II: Wiederholbarkeit aus demselben Extrakt

c) Stabilität der Acetacetatkonzentration in einer Urinprobe (s. Tab III)

Die Urinproben wurden von stoffwechselgesunden Probanden gewonnen und sofort abzentrifugiert. Bei den Aufarbeitungskontrollen fanden wir folgende Ergebnisse (zusammengestellt in Tab. III):

Der mittlere Gehalt an Acetacetat nahm beim Stehenlassen der 8 verschiedenen Urinproben von Normalpersonen in allen Fällen ab. Nach 4 Std. bei Zimmertemperatur bemerkten wir eine mittlere Abnahme um 7,34 % von 80 µMol/l auf 74,13 µMol/l. Diese durchschnittliche Abnahme gegenüber dem Ausgangswert war signifikant. Nach 24 Std. bei Zimmertemperatur betrug die Abnahme im Mittel 9,53 % ($p < 0,10$).

Ähnliche Ergebnisse erbrachte das Stehenlassen der Urinproben bei Kühltemperatur von 4°C. Nach 4 Std. war der Gehalt an Acetacetat durchschnittlich um 7,34 % gesunken, nach 24 Std. um 8,75%. Diese Abnahmen gegenüber dem Ausgangswert waren ebenfalls signifikant ($p < 0,05$).

			sofort		nach 4 Std. bei Zi. Temp.		nach 24 Std. bei Zi. Temp.		nach 4 Std. bei Kühltemp.		nach 24 Std. bei Kühltemp.	
Nr.	F	Verd.	△ E	/uMol/l	△ E	/uMol/l	△ E	/uMol/l	△ E	/uMol/l	△ E	/uMol/l
1	814	1:1	0.095	77	0.080	65	0.081	66	0.081	66	0.078	63
2	814	1:1	0.086	70	0.088	72	0.084	68	0.085	69	0.078	63
3	814	1:1	0.060	49	0.052	42	0.059	48	0.044	36	0.044	36
4	1624	1:4	0.080	130	0.075	122	0.063	102	0.075	122	0.072	117
5	836	1:1	0.080	67	0.081	68	0.074	62	0.080	67	0.089	74
6	836	1:1	0.087	73	0.081	68	0.085	71	0.081	68	0.083	69
7	836	1:1	0.105	88	0.091	76	0.093	78	0.097	81	0.093	78
8	836	1:1	0.103	86	0.096	80	0.100	84	0.100	84	0.101	84
$\bar{x}$				80,0		74,13		72,38		74,13		73,0
				± 23,55								
Abw. geg. Ausgangswert	in /uMol/l					- 5,87		- 7,62		- 5,87		- 7,00
	± S					± 5,22		± 9,09		± 4,73		± 7,23
	in %					- 7,34		- 9,53		- 7,34		- 8,75
$S_{\bar{x}}$				± 8,32		± 1,84		± 3,21		± 1,67		± 2,59
p						< 0,05		< 0,10		< 0,05		< 0,05

Tabelle III: Stabilität in einer Urinprobe

d) Stabilität der Acetacetatkonzentration im neutralen Extrakt (s. Tab. IV)

Urin wurde mit $HClO_4$ versetzt und wie unter II, c) 2. beschrieben neutralisiert. Der zentrifugierte und dekantierte Extrakt wurde über 9 Tage bei 4°C aufbewahrt. Innerhalb dieses Zeitraumes war praktisch kein Verlust an Acetacetat zu bemerken (Tab. IV).
Am 9. Tag fanden wir im Mittel 3,75 % weniger Acetacetat gegenüber dem Ausgangswert. Das entspricht einem Abfall von 1265,16 µMol/l auf 1217,83 µMol/l und muß als zufällig gewertet werden ($p < 0,20$).

Nr.	△ E /uMol/l 15. 8.		△ E /uMol/l 17. 8.		△ E /uMol/l 21. 8.		△ E /uMol/l 24. 8.	
1	0.305	1275	0.300	1254	0.298	1246	0.297	1241
2	0.299	1250	0.298	1246	0.295	1233	0.297	1241
3	0.303	1267	0.294	1229	0.294	1229	0.301	1258
4	0.300	1254	0.305	1275	0.310	1296	0.303	1267
5	0.304	1270	0.308	1287	0.299	1250	0.275	1150
6	0.305	1275	0.295	1233	0.303	1267	0.275	1150
$\bar{x}$		1265,16 ± 24,08		1254,00		1253,50		1217,83
Abw. geg. Ausgangswert	in /uMol/l			- 11,17		- 11,66		- 47,33
	± S			± 27,00		± 28,90		± 60,12
	in %			- 0,88		- 0,92		- 3,75
$S_{\bar{x}}$		± 9,83		± 11,02		± 11,71		± 24,54
p				< 0,40		< 0,40		< 0,20

Tabelle IV: Stabilität im neutralen Extrakt

2. ß-Hydroxybuttersäure

a) Kontrolle der Empfindlichkeit (s. Tab. V)

Die Extinktion der Leerwerte schwankte hier von E = 0.017 bis E = 0.043. Dies entspricht einem ß-Hydroxybuttersäuregehalt von im Mittel 19,5 µMol/l bei einer Streubreite von 10,0 µMol/l bis 26 µMol/l. Die Standardabweichung betrug S = 6,3 µMol/l. Für die Empfindlichkeit ergibt sich nach der Definition 12,6 µMol/l.

Nr.	Extinktion	µMol/l
1	0.030	18
2	0.042	25
3	0.022	13
4	0.040	24
5	0.042	25
6	0.017	10
7	0.035	21
8	0.043	26
9	0.040	24
10	0.042	25
11	0.020	12
12	0.022	13
$\bar{x}$		19,5
S		± 6,3
Vk		32,3 %
F 605		

Tabelle V: Leerwerte zur ß-Hydroxybuttersäure-Bestimmung

b) Wiederholbarkeit der ß-Hydroxybuttersäurebestimmung aus demselben Extrakt (s. Tab. VI)

Wie bei der Acetacetatbestimmung wurden aus einer von einem Diabetiker gewonnenen Urinprobe 10 Bestimmungen unter identischen Bedingungen vorgenommen. Auch hier fand sich eine gute Wiederholbarkeit. Wir fanden im Mittel eine ß-Hydroxybuttersäurekonzentration von 1864,1 µMol/l bei einer Streubreite von 1735 µMol/l bis 1955 µMol/l. Die Standardabweichung betrug 60,1 µMol/l bei einem mittleren Fehler des Mittelwertes von 18,96 µMol/l und einem Variationskoeffizienten Vk von 3,2 %.

Nr.	Extinktion	gefunden µMol/l
1	0.347	1893
2	0.347	1893
3	0.352	1920
4	0.342	1856
5	0.318	1735
6	0.343	1871
7	0.353	1955
8	0.335	1827
9	0.340	1855
10	0.335	1827
$\bar{x}$		1864,1
S		60,1
$S_{\bar{x}}$		18,96
Vk		3,2 %
Verd.	1 : 8	
F	5456	

Tabelle VI: Wiederholbarkeit aus demselben Extrakt

c) Stabilität der ß-Hydroxybuttersäurekonzentration in einer Urinprobe (s. Tab. VII)

Auch hier wurden die einzelnen Urinproben von stoffwechselgesunden Probanden gewonnen und sofort abzentrifugiert. Bei den Aufarbeitungskontrollen fanden sich folgende Ergebnisse:
Sowohl beim Stehenlassen der Urinproben bei Zimmertemperatur über 4 Std. als auch bei Kühltemperatur von 4°C über denselben Zeitraum nahm der durchschnittliche Gehalt an ß-Hydroxybuttersäure nur um 0,77% von 177,88 µMol/l auf 176,50 µMol/l ab. Diese Abnahme ist geringfügig und nicht zu beweisen.

			sofort		nach 4 Std. bei Zi. Temp.		nach 4 Std. bei Kühltemp.	
Nr.	F	Verd.	Δ E	/uMol/l	Δ E	/uMol/l	Δ E	/uMol/l
1	1364	1 : 1	0.209	285	0.211	288	0.208	284
2	1364	1 : 1	0.211	288	0.216	295	0.218	297
3	1364	1 : 1	0.055	75	0.048	65	0.050	68
4	3410	1 : 5	0.065	222	0.068	232	0.069	235
5	1424	1 : 1	0.095	135	0.096	137	0.091	130
6	1424	1 : 1	0.073	104	0.077	109	0.074	105
7	1424	1 : 1	0.105	150	0.104	148	0.109	155
8	1424	1 : 1	0.115	164	0.097	138	0.097	138
$\bar{x}$				177,875 ± 79,64		176,50		176,50
Abw. geg. Ausgangswert		in /uMol/l				- 1,375		- 1,375
		± S				± 11,661		± 12,023
		in %				- 0,77		- 0,77
$S_{\bar{x}}$				± 28,14		± 4,22		± 4,53
p						< 0,90		< 0,90

Tabelle VII: Stabilität in einer Urinprobe

d) Stabilität der ß-Hydroxybuttersäurekonzentration im alkalischen Extrakt (s. Tab. VIII)

Der Extrakt wurde über 6 Tage bei 4°C aufbewahrt. Nach 2 Tagen fand sich eine zufällige Abnahme des Gehaltes an ß-Hydroxybuttersäure um 2,25 % von 1862,83 µMol/l auf 1821,0 µMol/l. Die Abnahme gegenüber dem Ausgangswert betrug nach 5 Tagen 2,54 % und war ebenfalls nicht relevant. Nach 6 Tagen war jedoch der Gehalt an ß-Hydroxybuttersäure um 4,49 % gesunken, was einer signifikanten Abnahme ($p < 0,05$) gegenüber dem Ausgangswert entspricht.

Nr.	△ E 6.9.	µMol/l	△ E 8.9.	µMol/l	△ E 11.9.	µMol/l	△ E 12.9.	µMol/l
1	0.347	1893	0.343	1871	0.338	1844	0.342	1865
2	0.347	1893	0.325	1773	0.342	1865	0.331	1806
3	0.352	1920	0.325	1773	0.333	1816	0.321	1751
4	0.342	1865	0.335	1827	0.323	1752	0.317	1729
5	0.318	1735	0.340	1855	0.328	1789	0.319	1740
6	0.343	1871	0.335	1827	0.335	1827	0.327	1784
$\bar{x}$		1862,83 ± 65,63		1821,0		1815,5		1779,17
Abw. geg. Ausgangswert		in µMol/l		- 41,83		- 47,33		- 83,66
		± S		± 83,43		± 60,29		± 26,46
		in %		- 2,25		- 2,45		- 4,49
$S_{\bar{x}}$		± 26,79		± 34,05		± 24,61		± 26,46
p				< 0,20		< 0,20		< 0,05

Tabelle VIII: Stabilität im alkalischen Extrakt

e) Linearität und Richtigkeit der Bestimmung von ß-Hydroxybuttersäure in wässriger Testlösung (s. Tab. IX, Abb. I)

Die Eichkurve verläuft in dem Bereich zwischen 50 µMol/l und 800 µMol/l linear. Es wurden im Mittel 98,25 % der eingesetzten Menge wiedergefunden bei einer Standardabweichung von 12,03 % und einem Streubereich von 88,25 % bis 116,0 %. Aus dem Regressionskoeffizienten von 0,8718 ergibt sich, daß im linearen Bereich der Eichkurve die eingesetzte Menge an ß-Hydroxybuttersäure praktisch völlig wiedergefunden wurde.

Nr.	Einwaage µMol/l	Extinktion	gefunden	Ausbeute in %
1	50	0.086	58	116,00
2	100	0.161	109	109,00
3	200	0.286	193	96,50
4	400	0.532	359	88,25
5	600	0.810	546	91,00
6	800	1.052	710	88,75
$\bar{x}$				98,25
S				± 12,03

Aus diesen Werten erfolgte die Korrelations-Regressionsberechnung:
Regressionskoeffizient (b) : 0,8718
Regressionsgerade : y = 0,8718 x + 22,77
Korrelation r = 0,9988

Tabelle IX: Ergebnisse in wässriger Testlösung

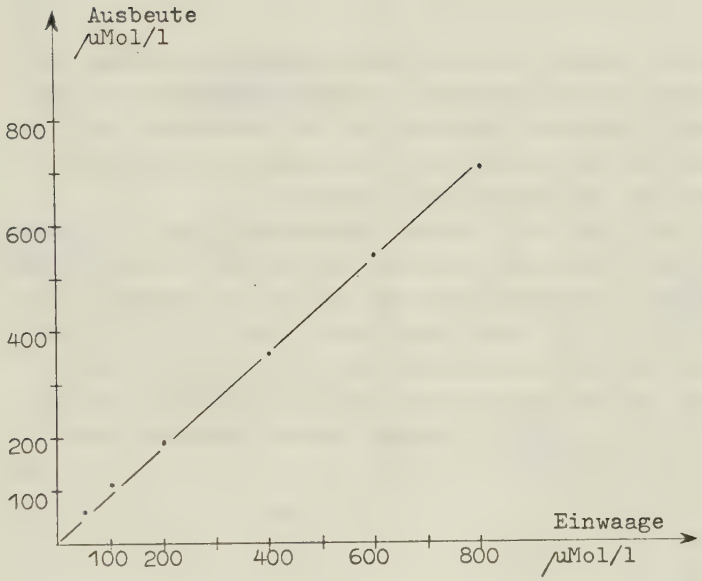

Abbildung I: Graphische Darstellung der in Tabelle IX gefundenen Werte

f) Linearität und Richtigkeit der Bestimmung von ß-Hydroxybuttersäure in einer Urinprobe
(s. Tab. X, Abb. II)

Für die Zumischversuche wurde ß-Hydroxybuttersäuretestlösung in steigenden Konzentrationen einer normalen Urinprobe zugesetzt, in der Urinprobe die ß-Hydroxybuttersäurekonzentration bestimmt und als Leerwert von den Mischproben abgezogen.
Es fand sich eine linear verlaufende Kurve. Im Mittel wurden 87,63 % der eingesetzten Menge an ß-Hydroxybuttersäure wiedergefunden bei einer Standardabweichung von 6,27 % und einer Streubreite von 83,3 % bis 99,0 %. Aus dem Regressionskoeffizienten von 0,8584 ergibt sich, daß die eingesetzte Menge in dem geprüften Bereich auch in der Urinprobe linear wiedergefunden wurde. Die Differenz zum Sollwert ist mit 12,37 % signifikant.

Leerwert	Nr.	Testlösung µMol/l	△ E	△ E - △ E LW	gefunden µMol/l	Ausbeute %
E:						
0.075 ≙	1	50	0.153	0.078	42	84,0
93 µMol/l	2	100	0.259	0.184	99	99,0
	3	200	0.385	0.310	168	84,0
F: 1244	4	400	0.718	0.643	351	88,0
	5	600	0.992	0.917	500	83,3
	6	800	1.291	1.216	700	87,5
	$\bar{x}$					87,63 %
	S					6,27 %
	F : 541					

Regressionskoeffizient (b) : 0,8584
Regressionsgerade : y = 0,8584 x + 2,407
Korrelation r = 0,9990

Tabelle X: Ergebnisse der Zumischversuche in einer Urinprobe

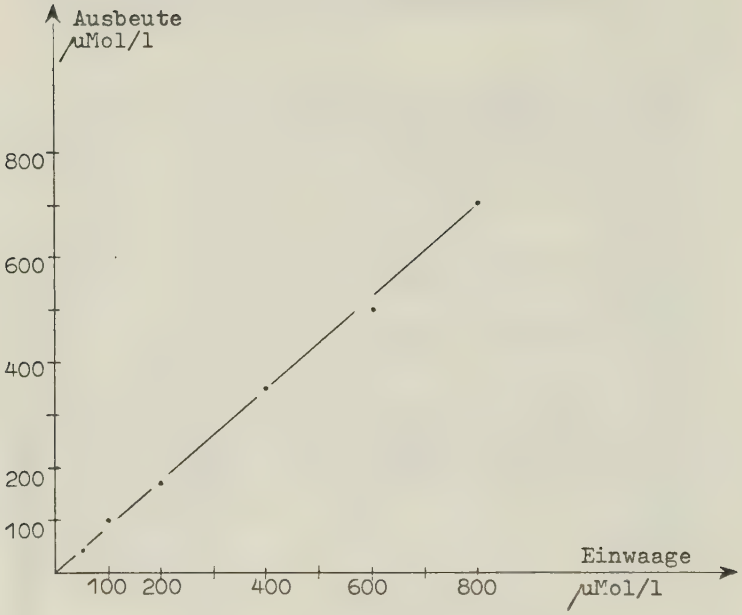

Abbildung II: Graphische Darstellung der in Tabelle X gefundenen Werte

Eingesetzte Menge:

0,5 ml Überstand
0,5 ml Testlösung
0,5 ml Puffer
0,01 ml LDH/MDH
0,1 ml NAD
0,02 ml ß-HBDH

3. Vergleiche Untersuchungen des Acetessigsäure- (und ß-Hydroxybuttersäure-) Gehaltes im Urin mit Acetest^{R} und Ketostix^{R} und mit der enzymatischen Meßmethode

a) Grundlagen und methodische Angaben für den Gebrauch der Schnellreagenzien Acetest^{R} und Ketostix^{R}

1. Prinzip:
Der Nachweis von Aceton und Acetessigsäure mit Acetest^{R} und Ketostix^{R} beruht auf der Legalschen Probe. Beide Ketonkörper, nicht jedoch ß-Hydroxybuttersäure, bilden in Anwesenheit von Glykokoll einen Farbkomplex. Dabei wirkt Natriumphosphat als Puffer, während die Farbqualität durch das Vorhandensein von Lactose erhöht wird (16).

2. Ausführung:
Die exakten Ausführungsbestimmungen sind den von der Fa. Merck, Darmstadt, hergestellten Testpackungen zu entnehmen.
Unsere Erfahrung bestätigt, daß die angegebenen Ablesezeiten von 30 sec. für Acetest^{R} bzw. 15 sec. für Ketostix^{R} genau eingehalten werden müssen. Später auftretende Verfärbungen dürfen nicht mehr gewertet werden. Unspezifisch positive Proben sind zu bedenken (s. Diskussion).

3. Angegebene Empfindlichkeit der Methoden:
Da die Nitroprussidprobe in viel höherem Maße auf Acetessigsäure als auf Aceton ansprechen soll, wird auch mit Acetest^{R} und Ketostix^{R} hauptsächlich Acetessigsäure nachgewiesen.
Spuren von Acetessigsäure (4 mg/100 ml) ergeben mit Acetest^{R} angeblich bereits eine leichte Violettfärbung, während mit Ketostix^{R} 5 mg/100 ml nachgewiesen werden sollen.

Nach HÜTTIG (11) gilt folgende Ablesegenauigkeit:

		Acetessigsäure	Aceton
Acetest^{R}	schwach	10 - 20 mg%	25 - 50
	mittel	25 - 40 mg%	200 - 250
	stark	über 50 mg%	400 - 1000
Ketostix^{R}	schwach	10 - 20 mg%	80 - 140
	mäßig	30 - 50 mg%	320 - 520
	stark	80 -120 mg%	1600 - 2400

b) Beschreibung der Versuche mit Acetest^{R} und Ketostix^{R}

Es wurden insgesamt 38 Urinproben von diabetischen Patienten untersucht, deren Gehalt an Acetessigsäure mit Hilfe von Acetest^{R} und Ketostix^{R} festgestellt werden sollte. Um daran quantitative Vergleiche mit der enzymatischen Methode anschließen zu können, wurden die Proben so ausgewählt, daß etwa gleich viele negative wie schwach positive Proben untersucht wurden.
So konnten wir einen Schwellenbereich festlegen, innerhalb dessen sich die Acetest^{R}-Tablette bzw. das Ketostix^{R}-Stäbchen deutlich positiv färbte.
Wir stellten gleichzeitig fest, daß sich in einzelnen Fällen das Ketostix^{R}-Stäbchen bereits ganz schwach anfärbte, während die Acetest^{R}-Tablette bei derselben Urinprobe noch keinen Farbumschlag zeigte. Dabei wurden die vorgeschriebenen Ablesezeiten mit der Stoppuhr genau eingehalten.

c) Beschreibung der enzymatischen Messungen und Vergleich der beiden Meßreihen (s. Tab. XI)

Dieselben 38 Urinproben von Diabetikern wurden nach der unter II, c) 2. angegebenen Methode aufgearbeitet und ihr Gehalt an Acetessigsäure (und ß-Hydroxybuttersäure) quantitativ photometrisch bestimmt.

Der Vergleich zwischen den quantitativ photometrischen Resultaten und den mit den Schnellreagenzien gewonnenen Ergebnissen zeigte, daß mit zunehmender Verfärbung der Acetest^{R}-Tablette bzw. des Ketostix^{R}-Stäbchens auch eine Zunahme der Acetessigsäurekonzentration zu beobachten war.
Wie jedoch schon erwähnt wurde, erfolgte der Farbumschlag bei Acetest^{R} und Ketostix^{R} in derselben Urinprobe in einigen Fällen nicht parallel. Dies war vor allem in den unteren Bereichen der Fall. Hier stellten wir in einem Fall schon bei einem Acetessigsäuregehalt von 61 µMol/l Urin (= 0,62 mg%) eine ganz schwache Verfärbung des Ketostix^{R}-Stäbchens fest.
Bezogen auf den angeblich empfindlicheren Farbumschlag bei Acetest^{R} ergab sich für die Schwellenwertsbestimmung folgender Bereich:
Bis zu einem Gehalt an Acetessigsäure von 89 µMol/l Urin blieb die Verfärbung der Acetest^{R}-Tablette eindeutig aus. In dem Bereich zwischen 89 µMol/l (= 0,91 mg%) und 231 µMol/l (= 2,36 mg%) war die Verfärbung noch nicht eindeutig positiv, sondern nur ganz schwach angedeutet vorhanden.
In dem Bereich zwischen 234 µMol/l und 625 µMol/l ließ sich jedoch eine deutliche schwache Verfärbung sowohl der Acetest^{R}-Tablette als auch des Ketostix^{R}-Stäbchens feststellen. Umgerechnet entspricht dies einem Acetessigsäuregehalt von 2,39 mg% bzw. 6,38 mg%.

Urinproben nach dem enzymatisch bestimmten Acetessigsäuregehalt geordnet und mit Schnellreagenzien auf Ketonkörper geprüft (Probengruppe: Ketonkörper negativ bis eben positiv)

Nr.	Acetacetat /uMol/l	ß-OH-Butyrat /uMol/l	Verhältnis Acetacetat : ß-OH-Butyrat	Ketostix®	Acetest®
1	25	51	1 : 2,0	Ø	Ø
2	25	146	1 : 5,8	Ø	Ø
3	44	249	1 : 6,6	Ø	Ø
4	61	194	1 : 3,1	Ø	Ø
5	61	408	1 : 6,6	Ø - (+)	Ø
6	64	105	1 : 1,6	Ø	Ø
7	67	425	1 : 6,7	Ø - (+)	Ø
8	73	215	1 : 2,9	Ø	Ø
9	75	275	1 : 3,4	Ø - (+)	Ø
10	77	186	1 : 2,4	Ø	Ø
11	80	413	1 : 5,1	Ø	Ø
12	82	236	1 : 2,8	Ø - (+)	Ø
13	89	330	1 : 3,7	Ø	Ø
14	123	298	1 : 2,3	Ø - (+)	Ø - (+)
15	125	524	1 : 4,1	(+)	(+)
16	133	428	1 : 3,2	Ø - (+)	Ø - (+)
17	138	392	1 : 2,8	Ø - (+)	Ø - (+)
18	141	692	1 : 4,9	(+)	(+)
19	143	753	1 : 5,2	Ø - (+)	Ø - (+)
20	145	467	1 : 3,2	Ø - (+)	Ø - (+)
21	155	340	1 : 2,1	Ø - (+)	Ø - (+)

Nr.	Acetacetat	ß-OH-Butyrat	Verhältnis Acetacetat : ß-OH-Butyrat	Ketostix®	Acetest®
22	173	1166	1 : 6,7	Ø - (+)	Ø - (+)
23	186	584	1 : 3,1	Ø - (+)	Ø - (+)
24	231	684	1 : 2,9	Ø - (+)	Ø - (+)
25	234	683	1 : 2,8	(+)	(+)
26	252	319	1 : 1,4	(+)	(+)
27	255	1095	1 : 4,2	(+)	(+)
28	272	496	1 : 1,8	(+)	(+)
29	280	562	1 : 2,0	(+)	(+)
30	293	551	1 : 1,8	(+)	(+)
31	311	380	1 : 1,2	(+)	(+)
32	319	555	1 : 1,7	(+)	(+)
33	322	535	1 : 1,6	(+)	(+)
34	330	362	1 : 1,1	(+)	(+)
35	375	533	1 : 1,4	(+)	(+)
36	471	325	1 : 0,7	(+)	(+)
37	473	654	1 : 1,4	(+)- +	(+)
38	625	591	1 : 0,9	(+)	(+)

Tabelle XI: Vergleich der beiden Meßreihen

Zeichenerklärung:

Ø = negativ
Ø - (+) = negativ bis schwach positiv
(+) = schwach positiv
(+)- + = schwach bis mäßig positiv

Da ß-Hydroxybuttersäure mit Acetest^{R} und Ketostix^{R} nicht erfaßt wird, wurde der jeweilige Gehalt an ß-Hydroxybuttersäure in der einzelnen Urinprobe nicht in den Vergleich miteinbezogen.
Aus der Tabelle ergibt sich jedoch, daß das Verhältnis von Acetessigsäure zu ß-Hydroxybuttersäure in diesen 38 Urinproben durchschnittlich 1 : 3,0 ist. Dies entspricht in etwa dem vom BERGMEYER und EGGSTEIN angegebenen Verhältnis der beiden Substanzen im Vollblut von 1 : 2,8 (2, 8).

4) Beschreibung der Ketonaemie und Ketonurie unter Nulldiät

a) Ergebnisse der enzymatischen Acetessigsäurebestimmung im Vollblut (s. Tab. XII, Abb. III)

Bei 10 stoffwechselgesunden Normalpersonen wurde die Ketonaemie untersucht, die während eines 4-tägigen Hungerversuches auftrat. Dabei zeigte es sich, daß schon nach 12-stündigem Fasten die Acetessigsäurekonzentration signifikant höher lag, und diese Zunahme unter Hunger mindestens über 4 Tage anhielt. Acetessigsäure wies eine Konzentrationszunahme um die 3-6-fache Normalmenge bei 12-stündigem Hungern auf. Am Morgen des 4. Tages war die Konzentration der Acetessigsäure im Blut auf das 30-fache des Anfangswertes angestiegen. Eine Tagesrhythmik durch unterschiedliches Verhalten der Morgen- und Abendwerte ließ sich an unserem Untersuchungsgut nicht beweisen (7).

N	8^{00} 1. Tag	20^{00}	8^{00} 2. Tag	20^{00}	8^{00} 3. Tag	20^{00}	8^{00} 4. Tag
1 Ge.	43	179	686	778	806	876	1208
2 Go.	8	171	440	480	612	593	779
3 Ha.	69	-	527	469	562	539	613
4 Do.	27	96	63	123	-	426	532
5 Er.	29	187	302	670	821	657	-
6 Fe.	19	138	136	370	578	777	-
7 Ha.	21	88	184	284	517	604	706
8 Pf.	29	-	709	937	1070	994	1075
9 St.	12	-	522	724	730	636	989
10 St.	20	-	798	673	815	780	-
$\bar{x}$	27,7 ± 17,5	143,17	437,10	550,80	723,44	688,60	843,14
Abw. geg Ausgangswert in µMol/l ± S		+ 119 ± 41,7	+ 409 ± 254,05	+ 523,2 ± 248,9	+ 695,5 ± 176,5	+ 660,5 ± 169,1	+ 810,7 ± 251,9
Abw. geg Ausgangswert in %		+ 417	+ 1478	+1889	+2512	+2386	+2944
$S_{\bar{x}}$	± 5,54	± 17,0	± 80,39	± 78,76	± 58,85	± 53,51	± 95,06
p		< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001

Tabelle XII: Acetacetat im Blut in µMol/l während 4 Hungertage

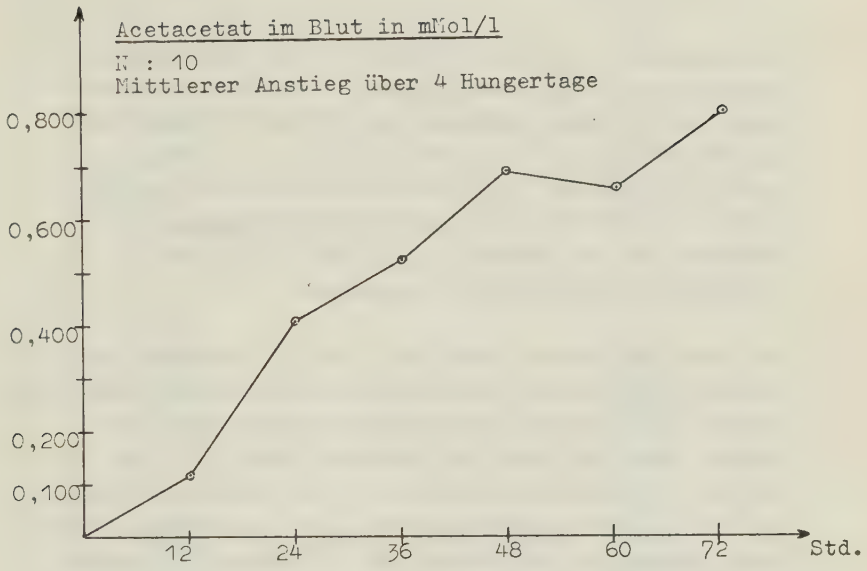

Abbildung III: Acetacetat im Blut in mMol/l.
Mittlerer Anstieg über 4 Hungertage

⊙ = signifikant geg. Ausgangswert

b) Ergebnisse der mit Acetest^{R} und Ketostix^{R} bestimmten Acetessigsäurekonzentration im Urin
(s. Tab. XIII)

Gemeinsam mit der Ketonaemie wurde bei jeder Versuchsperson über 4 Tage jeweils nach 12 Std. die ausgeschiedene Urinmenge gemessen und deren Konzentration an Ketonkörpern mit Acetest^{R} und Ketostix^{R} semiquantitativ erfaßt. Die Urinproben wurden sofort tiefgefroren, um für eine quantitative Bestimmung der Acetessigsäurekonzentration mit möglichst kleinen Probenahmefehlern rechnen zu müssen.

Die erste Urinprobe wurde bei allen 10 Probanden nach 12-stündigem Hungern untersucht. Bei 9 Personen war hier bereits ein schwacher bis mäßiger Gehalt an Ketonkörpern festzustellen. Der Anstieg hielt über den geprüften Zeitraum von 4 Tagen an, ohne daß es mit dieser Nachweismethode möglich war, die Konzentrationszunahme genauer zu differenzieren. In einem Fall zeigte sich erst am Morgen des 3. Hungertages ein schwach bis mäßig positiver Ausfall der Ketonkörperbestimmung.

	1. Tag		2. Tag				3. Tag				4. Tag	
	20^{00}		8^{00}		20^{00}		8^{00}		20^{00}		8^{00}	
N	µMol/l	Keto-stix	µMol/l	Keto-stix	µMol/l	Keto-stix	µMol/l	Keto-stix	µMol/l	Keto-stix	µMol/l	Keto-stix
1	627	+	9150	++	7550	++	10700	++	10200	++	10700	++
2	206	(+)	3800	++	3175	++	6650	++	2300	+	4525	-
3	795	+	7450	++	6250	++	8550	++	-	-	9450	++
4	104	Ø	42	Ø	29	Ø	915	(+)-+	2625	+	4275	+
5	128	Ø - (+)	2975	+	1475	+	3200	++	4850	++	-	-
6	59	Ø - (+)	4775	+	830	+	7100	++	16100	++	-	-
7	135	Ø - (+)	10550	++	2875	++	-	-	15500	++	16400	++
8	1290	+	-	-	12500	++	20700	++	15700	++	18200	++
9	201	(+) - +	6688	++	3720	++	6688	++	6228	++	-	-
10	420	(+)	8569	++	7064	++	6270	++	6688	++	5727	+

Tabelle XIII: Enzymatisch bestimmte Acetacetatkonzentrationen im Urin in µMol/l im Vergleich mit durch Ketostix®-Teststreifen gewonnenen Ergebnissen, gemessen über 4 Hungertage

Zeichenerklärung:

Ø = negativ
Ø - (+) = negativ bis schwach
(+) = schwach
(+) - + = schwach bis mäßig
+ = mäßig
++ = stark

c) Ergebnisse der enzymatisch bestimmten Acetessigsäurekonzentration im Urin (s. Tab. XIV)

Die tiefgefrorenen Urinproben wurden nach dem Auftauen sofort aufgearbeitet und ihr Gehalt an Acetessigsäure enzymatisch bestimmt. Es war in fast allen Fällen notwendig, die zum optischen Test einzusetzenden neutralen Überstände stark zu verdünnen, weil eine Extinktionsdifferenz bei der Messung von E = 0.500 aus meßmethodischen Gründen nicht überschritten werden sollte.
Die Extinktion von E = 0.500 entspricht einer Acetessigsäurekonzentration von 209 µMol/l. Wie beschrieben, setzt aber erst in diesem Bereich eine deutlich wahrnehmbare Verfärbung der Acetest^{R}-Tablette bzw. des Ketostix^{R} Stäbchens ein.
Die gefundenen Acetessigsäurekonzentrationen im Urin wurden nun jeweils auf die ausgeschiedene 12 Std.-Urinmenge bezogen. Dabei bemerkten wir im Probandenkollektiv erhebliche Schwankungen von Person zu Person in der Acetessigsäurekonzentration pro 12 Std.-Urinmenge. Wir stellten aber auch fest, daß über den geprüften Zeitraum von 4 Tagen nicht nur im Blut (EGGSTEIN), sondern auch im Urin eine starke Konzentrationszunahme erfolgte. Nach 4 Tagen war ein Gehalt an Acetessigsäure festzustellen, der dem 20-fachen des Ausgangswertes entsprach. Am Abend des 2. Hungertages beobachteten wir ein durchschnittliches Absinken des Acetessigsäuregehaltes um 31,1 % gegenüber dem Morgenwert desselben Tages. Dieser Abfall war signifikant.

Die Ergebnisse sind der Tabelle XIV und der entsprechenden graphischen Darstellung (s. Abb. IV) zu entnehmen.

Zwischen den enzymatisch bestimmten Werten und den von HÜTTIG (11) unter IV, 3. a) angegebenen Werten zur Beurteilung des Ketonkörpergehaltes mit Acetest^{R} und Ketostix^{R} besteht eine gute Übereinstimmung (s. Tab. XIII).

N	1. Tag 20^{00}	2. Tag 8^{00}	2. Tag 20^{00}	3. Tag 8^{00}	3. Tag 20^{00}	4. Tag 8^{00}
1	282	4118	3775	5885	5100	7704
2	103	2090	1429	2660	3910	2941
3	398	3576	2188	2907	-	5670
4	71	48	16	686	1181	2779
5	58	1726	1623	1920	3880	-
6	12	1671	232	1065	13685	-
7	81	5275	805	-	4340	4920
8	1161	-	4750	18630	16014	10556
9	140	2675	1674	3344	3114	-
10	202	6855	4945	5643	4682	4009
$\bar{x}$	250,8	3114,88	2144,50	4748,88	6212,66	5512,14
	± 340,34					
Abw. geg. Ausgangswert in /uMol/l	± S	+ 2965	+ 1893	+ 4479	+ 5977	+ 5183
		± 2025,99	± 1566,87	± 5167,87	± 4829,90	± 2463,00
	in %	+ 1142	+ 755	+ 1793	+ 2377	+ 2098
$S_{\bar{x}}$	± 107,70	± 675,33	± 495,73	± 1722,62	± 1609,90	± 929,43
p		< 0,01	< 0,01	< 0,05	< 0,01	< 0,001

Tabelle XIV: Acetacetat im Urin in /uMol/ 12 Std.-Menge

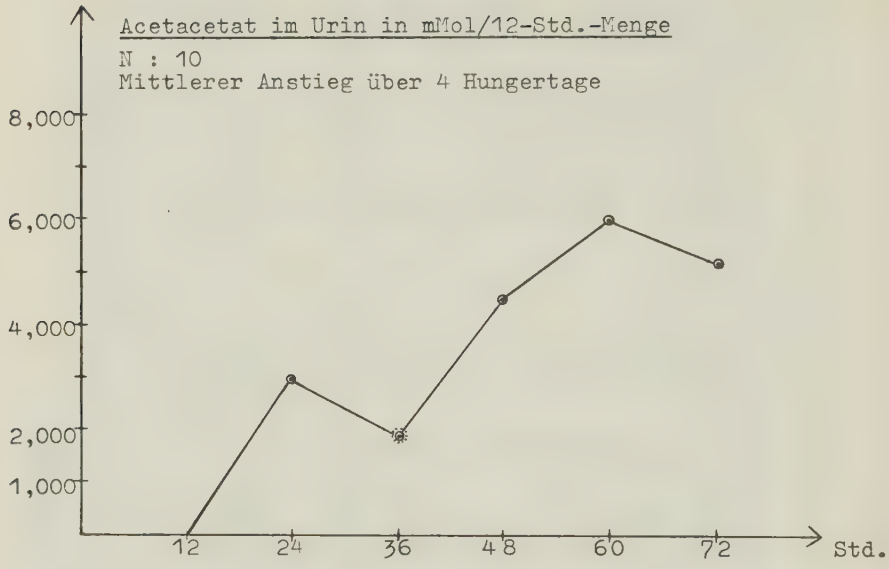

Abbildung IV: Acetacetat im Urin in mMol/12-Std.-Menge.
Mittlerer Anstieg über 4 Hungertage

⊙ = signifikant geg. vorhergehend. Wert
● = signifikant geg. Ausgangswert

d) Berechnung der Acetacetat - "Clearance" (s. Tab. XV)

Wir versuchten, aus den gefundenen Konzentrationen von Acetessigsäure in Blut und Urin die Nierenclearance für Acetessigsäure zu berechnen. Dies konnte jedoch nur ein orientierender Versuch sein, da wir von mittleren Blut- und Urinkonzentrationen ausgehen mußten.

Grundsätzlich ist die Clearance für eine Substanz definiert als diejenige Plasmamenge in ml, die in 1 min. von einer bestimmten Substanz befreit wird (in unserem Falle Acetessigsäure).

Für die Berechnung und den Vergleich standen die 12 Std.-Phasen vom 2. Tag zwischen 8^{00}- 20^{00}, vom 2./3. Tag zwischen 20^{00}- 8^{00}und vom 3. Tag zwischen 8^{00}- 20^{00} zur Verfügung.

Die mittleren Serumkonzentrationen aus 8^{00} - und 20^{00}-Werten lagen für die 3 Phasen

a) am 2. Tag : zwischen (93) 234 - 972/µMol/l, im Mittel 543,3/µMol/l,
die mittleren Clearancewerte dazu bei 4,67 ml/min. zwischen (0,2) 1,2 - 9,3 ml/min.

b) am 2./3. Tag: zwischen 400,5 - 1491/µMol/l, im Mittel 743,7/µMol/l,
die mittleren Clearancewerte dazu bei 9,03 ml/min. zwischen 1,7 - 25,7 ml/min.

c) am 3. Tag : zwischen 550,5 - 1478/µMol/l, im Mittel 802,5/µMol/l,
die mittleren Clearancewerte dazu bei 13,1 ml/min. zwischen 6,3 - 28,0 ml/min.

Dies entspricht für die 12 Std.-Phase vom 2./3. Tag einer signifikanten Zunahme der Acetessigsäurekonzentration um 36,88 % von im Mittel 150,77/µMol/l bei einer

Standardabweichung von ± 147,47 µMol/l. Dabei stieg die Clearance parallel dazu um 93,34 % an, was einer Zunahme von im Mittel 3,8 ± 5,7 ml/min. entspricht ($p < 0,2$).

Am 3. Tag war eine Konzentrationszunahme an Acetessigsäure im Blut um 47,71 % von durchschnittlich 175,83 ± 152,07 µMol/l festzustellen ($p < 0,01$). Der dazugehörige Clearancewert lag um 171,3 % höher als der Ausgangswert vom 2. Tag und entspricht einer mittleren Zunahme von 8,03 ± 9,17 ml/min. ($p < 0,05$).

Nr.	2. Tag		2./3. Tag		3. Tag	
	mittlere Serumconc. in µMol/l	Clearance in ml/min.	mittlere Serumconc. in µMol/l	Clearance in ml/min.	mittlere Serumconc. in µMol/l	Clearance in ml/min.
1	732	7,1	792	10,3	841	8,4
2	460	4,3	546	6,7	602,5	9,0
3	508	5,9	515,5	7,9	550,5	-
4	93	0,2	-	-	-	-
5	972	2,3	1491	1,7	1478	12,8
6	253	1,2	474	3,1	677,5	28,0
7	234	4,7	400,5	-	560,5	10,7
8	823	8,0	1003,5	25,7	1032	21,5
9	623	3,7	727	6,3	683	6,3
10	735,5	9,3	744	10,5	797,5	8,1
$\bar{x}$	543,3 ±285,2	4,67 ±4,58	743,7	9,03	802,5	13,1
Abw. geg. Ausgangswert	in µMol/l; in ml/min ± S	± S	+150,77 ±147,47	+ 3,8 ± 5,7	+175,83 ±152,07	+ 8,03 ± 9,17
	in %		+ 36,88	+93,34	+ 47,71	+171,3
$S_{\bar{x}}$	± 90,25	±1,51	± 49,16	± 2,02	± 50,69	± 3,24
p			< 0,05	< 0,20	< 0,01	< 0,05

Tabelle XV: Mittlere Serumkonzentration von Acetessigsäure in µMol/l und Berechnung der entsprechenden Clearancewerte in ml/min.

V. Diskussion

1. Acetacetat

a) Die enzymatische Bestimmung von Acetessigsäure im Urin entspricht in ihrer Empfindlichkeit und Zuverlässigkeit den Anforderungen der Klinik.

Nach der oben gegebenen Definition ist die Empfindlichkeit einer Methode definiert als die kleinste Menge eines Substrates, die neben dem Leerwert noch sicher bestimmt werden kann; sie muß um mindestens das 2-fache der Standardabweichung vom Leerwert größer als der Leerwert sein. Die Leerwerte entsprechen in unserem Versuchsansatz einem Acetessigsäuregehalt von im Mittel 14,727 ± 1,27 µMol/l. Aus der Standardabweichung für den Leerwert berechneten wir eine Empfindlichkeit von 2,54 µMol/l. Das bedeutet, daß eine Acetessigsäuremenge von > 2,6 µMol/l bei Ablesung gegen den Leerwert noch sicher bestimmt werden kann.

Nach BERGMEYER ist eine Extinktionsdifferenz von Δ E = 0.020 eben noch genügend genau bestimmbar. Das entspricht einer Empfindlichkeit von 8,36 µMol/l. Die von uns verwendeten Photometer mit Skalenspreizung erklären die um den Faktor 3 genauere Ablesung bei der experimentellen Festlegung der Empfindlichkeit. In der Praxis haben wir auf diese Empfindlichkeit jedoch im Hinblick auf den im Urin von Normalpersonen gefundenen durchschnittlichen Acetessigsäuregehalt von 80 ± 23,55 µMol/l verzichtet und ließen den Leerwert unberücksichtigt.

b) Die Wiederholbarkeit der Acetessigsäurebestimmung aus demselben Extrakt war ebenfalls sehr gut. Wir fanden bei unseren Messungen einen Variationskoeffizienten Vk von 1,18 %. Eine Eichkurve wurde nicht aufgestellt, da die Substanz Acetessigsäure leicht durch

Luftsauerstoff oxydiert wird (Tab. III).

c) Bei der Prüfung der Stabilität der Acetessigsäurekonzentration in Urinproben von 8 Normalpersonen unter verschiedenen Temperaturbedingungen stellten wir eine signifikante Konzentrationsabnahme um 7,34 % fest, nachdem die frischen Proben verschlossen über 4 Std. bei Zimmertemperatur stehengelassen worden waren.

Nach 24-stündigem Stehenlassen bei Zimmertemperatur war der Acetessigsäuregehalt um 9,53 % gesunken ($p < 0,10$) (Tab. III).

Ebenso war nach 4-stündigem Stehenlassen bei Kühltemperatur von 4°C eine Konzentrationsabnahme von 7,34 %, nach 24 Std. um 8,75 % zu bemerken. Auch diese Abnahmen waren gegenüber dem Ausgangswert mit $p < 0,05$ signifikant (Tab. III).

Daraus folgt, daß die frischgelassenen Urinproben sofort nach Vorschrift aufgearbeitet werden sollten, damit eine Abnahme des Acetessigsäuregehaltes durch Oxydation zu Aceton vermieden wird.

d) Neben der Stabilität der Acetessigsäurekonzentration prüften wir die Stabilität im neutralen Extrakt. Dazu wurden 0,4 ml Urin mit 4,0 ml $HClO_4$ versetzt und mit 0,5 ml K_3PO_4-Lösung neutralisiert (s. II, c) 2. bzw. Tab. IV). Bei einer Temperatur von + 4°C blieb der Gehalt an Acetessigsäure praktisch unverändert. Erst am 9. Tag nach der Aufarbeitung fanden sich um im Mittel 3,75 % geringere Acetessigsäurewerte. Diese Differenz zum Ausgangswert muß als zufällig gewertet werden ($p < 0,20$).

Aus diesen Messungen ergibt sich, daß die Urinproben zwar sofort nach ihrer Gewinnung "extrahiert" werden müssen, daß die photometrische Bestimmung jedoch nicht

unmittelbar angeschlossen zu werden braucht, da während des geprüften Zeitraumes von 9 Tagen praktisch keine relevante Konzentrationsabnahme im neutralen Extrakt erfolgte.

Bei der Bestimmungsmethode für Acetessigsäure beobachteten wir keine Störungen. Durch Verunreinigung der ß-HBDH mit MDH reagiert jedoch die Oxalessigsäure zu Apfelsäure. Da diese Reaktion ebenfalls NADH + H^+ verbraucht, muß in einer Vorreaktion diese Reaktion ablaufen. Wurde eine Extinktionsdifferenz von Δ E = 0.500 überschritten, so mußte der zum optischen Test eingesetzte Überstand entsprechend verdünnt werden.

2. ß-Hydroxybuttersäure

a) Auch bei der enzymatischen Bestimmungsmethode für ß-Hydroxybuttersäure fand sich eine hohe Empfindlichkeit. Eine Extinktionsdifferenz von $\Delta E = 0.020$ ist noch genügend genau bestimmbar (s. o.). Dies entspräche einem ß-Hydroxybuttersäuregehalt im Urin von 14,24 µMol/l. Bei unseren Leerwertbestimmungen fanden wir nach der Definition eine Empfindlichkeit von 12,6 µMol/l. Das bedeutet, daß eine ß-Hydroxybuttersäuremenge von 12,6 bzw. 14,24 µMol/l noch sicher bestimmt werden kann (Tab. V). Die Leerwerte lagen mit einem ß-Hydroxybuttersäuregehalt von im Mittel $19,5 \pm 6,3$ µMol/l zwar etwas höher, wurden jedoch nicht berücksichtigt, daß die ß-Hydroxybuttersäurekonzentration im Urin von Normalpersonen durchschnittlich bei einem vergleichsweise sehr viel höheren Wert von $177,88 \pm 79,64$ µMol/l liegt (Tab. VII).

b) Auch hier war die Wiederholbarkeit aus demselben Extrakt sehr gut. Bei unseren Messungen fanden wir einen Variationskoeffizienten Vk von 3,2 %.

Eine aufgestellte Eichkurve zeigte bis zu einem ß-Hydroxybuttersäuregehalt von 800 µMol/l einen linearen Verlauf. Dies entspricht dem 4-5-fachen Gehalt an ß-Hydroxybuttersäure, der in einer normalen Urinprobe zu finden ist. Bis zu dieser Menge wird sowohl bei niedrigem ß-Hydroxybuttersäuregehalt von 50 µMol/l als auch bei hohem ß-Hydroxybuttersäuregehalt von 800 µMol/l die vorliegende Menge an ß-Hydroxybuttersäure völlig wiedergefunden, wie der Regressionskoeffizient von 0,8718 zeigt. Bei höheren ß-Hydroxybuttersäuregehalten ist eine Verdünnung vorzunehmen, um in den linearen Bereich der Eichkurve zu kommen (s. Tab. IX, Abb. I).

Ebenso wurde für Zumischversuche zu einer normalen Urin-

probe eine Eichkurve aufgestellt, die bis zu 800 µMol/l zugemischten Substrates linear verlief. Im Mittel betrug die Ausbeute 87,63 ± 12,54 %; die Differenz zum Sollwert mit 12,37 % war dabei signifikant (s. Tab. X, Abb. II).

c) Wir prüften auch hier die Stabilität der ß-Hydroxybuttersäurekonzentration in Urinproben von 8 Normalpersonen unter verschiedenen Temperaturbedingungen und fanden folgende Ergebnisse: Sowohl beim Stehenlassen der Urinproben bei Zimmertemperatur über 4 Std. als auch bei Kühltemperatur über denselben Zeitraum war eine durchschnittliche Konzentrationsabnahme um nur 0,77 % festzustellen. Diese Abnahme war geringfügig und nicht relevant. Daraus folgt, daß eine sofortige Aufarbeitung des frischgelassenen Urins für die Bestimmung seines Gehaltes an ß-Hydroxybuttersäure nicht erforderlich ist. Sie erscheint jedoch im Hinblick auf die gleichzeitige Bestimmung von Acetessigsäure zweckmässig, da diese durch Oxydation zu Aceton eine erhebliche Konzentrationsabnahme erfährt (s. Tab. VII).

d) Weiterhin wurde die Stabilität der ß-Hydroxybuttersäurekonzentration im alkalischen Extrakt untersucht. Bei einer Temperatur von 4°C fand sich nach 2 Tagen eine geringe Abnahme um 2,25 % gegenüber dem Ausgangswert ($p < 0,20$), nach 5 Tagen um 2,54 % ($p < 0,20$). Nach 6 Tagen war der Gehalt an ß-Hydroxybuttersäure um 4,49 % gesunken, war einer signifikanten Abnahme gegenüber dem Ausgangswert entspricht. Für die photometrische Bestimmung sollte also eine Frist von längstens 5 Tagen nicht überschritten werden, damit ein zu starker Konzentrationsabfall vermieden wird (s. Tab. VIII).

Auch diese Methode ist empfindlich, zuverlässig und spezifisch und entspricht damit den an sie gestellten Anforderungen.

3. Vergleichende Untersuchungen des Acetessigsäure- und ß-Hydroxybuttersäuregehaltes im Urin mit Acetest^{R} und Ketostix^{R} und mit der enzymatischen Messmethode.

Wir untersuchten 38 Urinproben diabetischer Patienten, um einen Schwellenbereich für die Acetessigsäurekonzentration festzulegen, die zu einer deutlichen Verfärbung der Schnellreagenzien Acetest^{R} und Ketostix^{R} führte. Dabei ist zu berücksichtigen, daß beide Reagenzien auf der Legal'schen Probe beruhen, die nicht spezifisch für Ketonkörper ist. Sie fällt auch mit anderen Methylketonen und einigen weiteren Verbindungen positiv aus, die eine reaktionsfähige CH_2-Gruppe besitzen. Ebenso können Phenolphthalein, Phenolsulfothalein oder Bromsulfothalein eine falsche positive Reaktion ergeben (16).

Diese unspezifischen Reaktionsmöglichkeiten würden u. U. eine ganz schwache Verfärbung des Ketostix^{R}-Teststreifens bei von uns enzymatisch bestimmten Acetessigsäuregehalten von nur 66 bzw. 77 bzw. 82 µMol/l (≙ 0,62 bzw. 0,79 bzw. 0,84 mg%) erklären.

Eine deutlich wahrnehmbare Verfärbung beider Reagenzien bemerkten wir erst in dem Bereich zwischen 234 µMol/l (≙ 2,39 mg%) und 625 µMol/l (≙ 6,38 mg%), wobei die vorgeschriebenen Ablesezeiten genau mit der Stoppuhr eingehalten wurden.

Unsere Messergebnisse stimmten somit in etwa mit den von HÜTTIG angegebenen Empfindlichkeiten von 4 mg Acetacetat/100 ml für Acetest^{R} und 5 mg Acetacetat/100 ml für Ketostix^{R} überein. Mit beiden Schnellreagenzien lässt sich eine erhöhte Ketonkörperausscheidung im Urin recht gut beurteilen, sofern die oben genannten Störfaktoren ausgeschlossen werden können.

Eine exakte Messung des Gehaltes an Acetessigsäure und

insbesondere an ß-Hydroxybuttersäure, die mit beiden Schnellreagenzien nicht erfasst wird, lässt sich jedoch nur mit der enzymatischen Bestimmungsmethode durchführen.

Der Quotient aus Acetessigsäure- und ß-Hydroxybuttersäurekonzentration im Urin lag in den negativen bis ganz schwach positiven Urinproben (s. Tab. XI, Nr. 1-24) im Mittel bei 1 : 3,8. Die Einzelwerte streuten zwischen 1 : 6,7 und 1 : 1,6. In den deutlich positiven Proben (s. Tab. XI, Nr. 25-38) lag der Quotient im Mittel bei 1 : 1,7 und streute zwischen 1 : 4,2 und 1 : 0,7.

4. Ketonämie und Ketonurie unter Nulldiät

Wir untersuchten die Ketonämie und Ketonurie bei 10 stoffwechselgesunden Probanden während eines 4-tägigen Hungerversuchs. Dabei stellten wir fest, daß die Ketonkörperausscheidung im Urin dem Anstieg im Blut annähernd parallel verlief (s. Tab. XII, Abb. III).

Nach 12-stündigem Fasten lag die Acetacetatkonzentration im Blut mit im Mittel 143,17 µMol/l signifikant höher als der Anfangswert von durchschnittlich 27,7 µMol/l. Nach 12 Std. wurde auch die erste Urinprobe untersucht. Ihr Gehalt an Acetessigsäure lag mit im Mittel 250,8 µMol/12 Std.-Urinmenge bereits in dem Bereich, in dem die Ketonkörper mit Acetest^{R} und Ketostix^{R} semiquantitativ als schwach positiv nachgewiesen werden können.

Ebenso wie im Blut hielt der Anstieg der Acetacetatkonzentration im Urin über den geprüften Bereich von 4 Tagen an. Dabei war am Abend des 2. Hungertages eine signifikante Abnahme um 31,1 % gegenüber dem Morgenwert desselben Tages zu beobachten, während sich im Blut kein unterschiedliches Verhalten zwischen Morgen- und Abendwerten beweisen ließ (s. Tab. XIV, Abb. IV). Am Ende der 4-tägigen Hungerperiode war die Acetacetatkonzentration in der 12 Std.-Urinmenge auf das 20-fache, im Blut auf das 30-fache des Ausgangswertes angestiegen.

Wir versuchten nun, eine Beziehung zwischen Blut- und Urinkonzentrationen herzustellen, indem wir die Clearance für Acetacetat berechneten. Der Begriff "Clearance" war hier mit Vorbehalt zu gebrauchen, da wir von mittleren Blut- und Urinkonzentrationen ausgehen mußten. Bei der Berechnung zeigte sich, daß parallel zum Anstieg der mittleren Serumwerte auch ein Anstieg der durchschnittlichen Clearancewerte erfolgte, d. h. ein

Anstieg derjenigen Plasmamenge in ml, die in einer min. von Acetacetat befreit wird. Am 2./3. Tag war die mittlere Serumkonzentration um 36,88 %, die entsprechende Clearance um 93,34 % angestiegen. Am 3. Tag lag die mittlere Serumkonzentration um 47,71 %, die entsprechende Clearance um 171,3 % höher als die jeweiligen Ausgangswerte.

Mit der endogenen Kreatininclearance läßt sich die Acetacetat-Clearance nicht vergleichen, da Acetacetat in stets wechselnder Menge als Metabolit aus dem Fettsäurestoffwechsel im Blut vorliegt und keine konstanten Konzentrationen aufweist.

Grundsätzlich verliert der Organismus durch eine erhöhte Ausscheidung von Ketonkörpern energetisch wertvolle Metaboliten (5).

Geht man davon aus, daß die C_4-Ketosäuren noch 2/3 der Verbrennungsenergie einer Fettsäure besitzen, so entspricht eine Acetacetatausscheidung von 1000 mg etwa 6,06 Kal. Bei unserem 4-tägigen Hungerversuch wurden durchschnittlich 22.019,86 µMol Acetacetat insgesamt ausgeschieden (s. Tab. XIV). Umgerechnet sind dies 2248 mg und entsprechen damit einem Verlust von 13,6 Kal. Dieses Ergebnis zeigt, daß selbst unter so stark erhöhter Ketonkörperausscheidung wie während dieses 4-tägigen Hungerversuches der Kalorienverlust gesamtenergetisch betrachtet nicht ins Gewicht fällt.

VI. Zusammenfassung

1. Es wurden zwei modifizierte enzymatische Mikromethoden zur Bestimmung von Acetessigsäure und ß-Hydroxybuttersäure im Urin beschrieben.

a) Die Empfindlichkeit der enzymatischen Mikromethoden wurde durch Leerwertbestimmungen ermittelt, die Wiederholbarkeit durch Bestimmungen in aufgearbeiteten Urinproben geprüft. Weiterhin wurde die Stabilität der Substrate in Urinproben und im aufgearbeiteten Extrakt gemessen.

Die Linearität und Richtigkeit der Bestimmungsmethode für ß-Hydroxybuttersäure wurde durch Eichkurven in wässriger Testlösung und in Zumischversuchen in einer Urinprobe ermittelt.

b) Die schrittweise Aufarbeitung zeigte, daß bei der Bestimmung von Acetessigsäure die Urinprobe sofort mit Perchlorsäure versetzt und neutralisiert werden muß, um eine spätere Veränderung des Substratgehaltes zu vermeiden. Da beide Substrate meist gemeinsam bestimmt werden, gilt dies auch für ß-Hydroxybuttersäure.

Der Extrakt soll für die Bestimmung von ß-Hydroxybuttersäure nicht länger als 5 Tage aufbewahrt werden. Acetessigsäure erwies sich in neutralem Milieu über mindestens 9 Tage als stabil.

2. Mit der enzymatischen Mikromethode zur Bestimmung von Acetessigsäure wurde der Schwellenbereich ermittelt, innerhalb dessen die Schnellreagenzien Acetest^{R} und Ketostix^{R} eine schwach positive Reaktion auf Ketonkörper ergaben. Dieser liegt zwischen 234 - 625 µMol/l (= 2,39 - 6,38 mg%) und entspricht damit in etwa den von der Fa. E. MERCK, Darmstadt, angegebenen Empfind-

lichkeiten von 4 bzw. 5 mg/100 ml.

Das Verhältnis von Acetessigsäure zu ß-Hydroxybuttersäure, die mit den Schnellreagenzien nicht erfaßt wird, liegt wie im Blut durchschnittlich bei 1 : 3,0.

3. Während eines 4-tägigen Hungerversuches wurden die Ketonämie und Ketonurie bei 10 stoffwechselgesunden Probanden untersucht.

Sowohl im Blut als auch im Urin stieg die Acetacetatkonzentration stark an, so daß nach 4 Tagen die 30-fache Normalmenge im Blut und die 20-fache Menge des Ausgangswertes im Urin gefunden wurde.

Ebenso zeigte sich nach 4 Tagen ein Anstieg der Clearance für Acetacetat auf das 3-fache des Ausgangswertes.

Der Gesamtkalorienverlust während der Hungerperiode durch erhöhte Ketonkörperausscheidung im Urin fiel mit nur 13,6 Kal. nicht ins Gewicht.

Literaturverzeichnis

1. BERGMEYER, H. U.: Methoden der enzymatischen Analyse.
Verlag Chemie, Weinheim 1962.

2. BERGMEYER, H. U. und BERNT, E.: Enzymatische Bestimmung von Ketonkörpern im Blut.
Enzymol. biol. clin. 5, 65-76 (1965).

3. DECKER, K.: Ketonkörperstoffwechsel.
Dtsch. med. Wschr. 87, 2254-2258 (1962).

4. DIRR, K. und ENZINGER, E.: Über neue Rapidverfahren zum Nachweis von Zucker und Aceton im Harn.
Münch. med. Wschr. 96, 1128-1129 (1954).

5. EGGSTEIN, M.: Diabetes und Fett.
Med. Welt 18, (N. F.): 834-851 (1967).

6. EGGSTEIN, M.: Fett-Transport und Fettstoffwechsel.
Med. Mitt. (Melsungen) 39, 7-18 (1965).

7. EGGSTEIN, M.: Probleme der Fett- und Kohlenhydratstoffwechselüberwachung von Schwerkranken bei partieller und totaler parenteraler Ernährung.
Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 74, 321-333 (1968).

8. EGGSTEIN, M.: Modifizierte enzymatische Bestimmung der Acet-Acetat- und ß-Hydroxybutyratkonzentration im Blut.
In Vorbereitung.

9. FÖRSTER, H., MEHNERT, H. und STUHLFAUT, K.: Laboratoriumsmethoden zur Erkennung und Kontrolle des Diabetes mellitus.
Münch. med. Wschr. 107, 1441-1447 (1965).

10. HUGHES, H. K.: Suggested nomenclature in applied spectroscopy.
Analyt. Chem. 24, 1349-1354 (1952).

11. HÜTTIG, E.: Über den Gebrauchswert von Schnellreagenzien am Beispiel der Ames-Diagnostica.
Homburg-Information für den Werksarzt 13, 33-36 (1966).

12. LINDEN, U.: Die Bestimmung von Lactat, Pyruvat und Acetacetat im Blut.
Dissertation Tübingen 1966.

13. LYNEN, F., HENNING, K., BUBLITZ, C., SÖRBO, B., KROPLIN-RUEFF, C.: Der chem. Mechanismus der Acetessigsäurebildung in der Leber.
Biochem. Z. 330, 269-295, 1958.

14. PETERS, G.: Fastenkuren.
Zit. in Med. Klin. 63, 1209-1211 (1968).

15. RINK, M.: Die Harnanalyse.
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft
Stuttgart 1964.

16. ROTH, H. J.: Mechanismen und Spezifität der
harnanalytischen Schnelltests.
Dtsch. Apoth. Ztg. 106, 1442-1450
(1966).

17. WILLIAMSON, D. H., MELLANBY, J. and KREBS, H. A.:
Enzymic Determination of
D(-)ß-hydroxybutyric acid and
acetoacetic acid in blood.
Biochem. J. 82, 90-96, 1962.

Herrn Professor Dr. H. E. Bock möchte ich an dieser Stelle dafür danken, daß ich die für die vorliegende Dissertation notwendigen Arbeiten in den Laboratorien der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen durchführen durfte.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. M. Eggstein für die Überlassung des Themas und für seine Anleitung während der Arbeit.

Lebenslauf

Am 17. September 1944 wurde ich, Roswitha Wittemann, geb. Eisert, als zweites Kind des Dr. med. Herbert Eisert und seiner Ehefrau Carola, geb. Salzmann, in Waiblingen geboren.

Die Volksschule besuchte ich in Waiblingen und Bad-Ditzenbach.

Von 1954 bis 1963 besuchte ich das Neusprachliche Gymnasium in Geislingen/Steige. Dort bestand ich im März 1963 das Abitur.

Im Mai 1963 begann ich das Studium der Medizin an der Universität Tübingen. Im April 1964 legte ich dort das Vorphysikum und im Oktober 1965 das Physikum ab. Mein klinisches Studium verbrachte ich in Innsbruck und Tübingen. Im Februar 1969 bestand ich das Medizinische Staatsexamen in Tübingen.

Seit 1968 bin ich mit Herrn Gerhard Wittemann verheiratet. Im selben Jahr wurde unsere Tochter Nicola Susanne geboren. Seit April 1969 bin ich als Medizinalassistentin im Kreiskrankenhaus Geislingen tätig. Unser derzeitiger Wohnsitz ist Bad Ditzenbach.